



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 204 328**

⑫ Número de solicitud: 200202282

⑮ Int. Cl.7: **C12P 7/64**
// (C12P 7/64
C12R 1:865)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.10.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2004**

Fecha de la concesión: **08.08.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.09.2005

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES**

⑰ Inventor/es: **Camps Díez, Francisco;
Rodríguez Ropero, Sergio;
Fabriás Domingo, Gemma y
Piña Capo, Benjamín**

⑰ Agente: **No consta**

⑰ Título: **Procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados con levaduras por incorporación de sustratos olefínicos o acetilénicos.**

⑰ Resumen:

Procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados con levaduras por incorporación de sustratos olefínicos o acetilénicos.

La presente invención describe un procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados mediante la incorporación de ácidos grasos olefínicos o acetilénicos de 13-18 átomos de carbono de longitud de cadena como sustratos a una cepa silvestre haploide o diploide de levadura *Saccharomyces cerevisiae* W 303a ó DElo1 que permite la generación de un nuevo enlace de configuración Z en la posición 9 de dichos sustratos. La nueva desaturación sólo se produce si la instauración original en los productos suministrados tiene la configuración E o es un acetileno mientras que si el enlace original tiene la configuración Z el sustrato se recupera inalterado.

ES 2 204 328 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados con levaduras por incorporación de sustratos olefínicos o acetilénicos.

Sector de la técnica

Producción de ácidos grasos poliinsaturados para su utilización en las industrias farmacéuticas, agroalimentarias o cosméticas y como intermedios de síntesis en química fina. Ácidos linoleicos conjugados (CLA). Sector de la Biotecnología.

Estado de la técnica

Para afrontar la demanda creciente de ácidos grasos poliinsaturados en las industrias farmacéuticas, agroalimentarias o cosméticas, ha de recurrirse a la extracción de fuentes naturales donde se encuentran en forma de complejas mezclas de las que es prácticamente imposible o muy laborioso aislar los productos individuales por métodos cromatográficos o ha de aplicarse de manera alternativa la síntesis orgánica. Debido a la estereoespecificidad requerida, los productos sintéticos son generalmente preparados en pequeñas cantidades, su coste es muy elevado y sólo se utilizan en investigación.

Por ello, se ha recurrido a las fuentes naturales para preparar concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por métodos diversos tales como destilación molecular de los ésteres metílicos, separación con urea, empleo de lipasas para discriminación en la hidrólisis de triglicéridos aprovechando la especificidad respecto a las posiciones esterificadas del glicerol, a la naturaleza del éster, a la longitud de la cadena y a la posición de los dobles enlaces (Lipid Síntesis and Manufacture, Ed. by Frank D. Gunstone, Sheffield Academic Press, 1999, England).

Asimismo, en la literatura se encuentran descritos procedimientos para la preparación de ácidos grasos diénicos conjugados a partir de ácidos no conjugados. Entre ellos, los ácidos linoleicos conjugados (CLA) son los más importantes por su capacidad de reducir o eliminar el cáncer (Seidel, MC 2001, US Patent 6,319,950), de prevención de enfermedades cardiovasculares, de mejora del sistema inmunológico y de ayuda en tratamientos de la obesidad.

Estos ácidos linoleicos conjugados (CLA) se obtienen como mezclas por isomerización del ácido linoleico, ácido cis-9,cis-12-octadienoico, en medio homogéneo mediante la utilización de bases tales como hidróxido alcalino acuoso en un reactor de flujo tubular a una presión de 2300 psi y temperaturas elevadas (Krajca, K.E. 1979, U.S. Patent 4,164,505) o metóxido sódico (Iweta T, et al. 1998, EPO839897 A1) y deprotonación a temperaturas comprendidas entre -78 y -20°C con una base orgánica superfuerte como sec-butilitio, base de Schlosser y trimetilsililmetiluro de potasio (Sih. Ch and Chen Ch-A., 2001 US Patent 6,316,645). Se han utilizado también catalizadores homogéneos como tris(trifenilfosfina) cloruro de rodio (De Jarlas W., and Gast L.; J. Am. Oil Chem. Soc, 1971, 48, 21) y complejos de areno cromiocarbonilo (Frakel, E.; J. Am. Oil Chem. Soc, 1970, 47, 33) que facilitan que la reacción de isomerización pueda llevarse a cabo a temperaturas inferiores a los 180-200°C requeridos en el caso anterior. Sin embargo, estos catalizadores son difíciles de eliminar y no son compatibles con el medio ambiente. Por ello, recientemente se ha desarrollado un procedimiento utilizando un catalizador de Ni soportado sobre una zeolita preactivado con hidrógeno que permite llevar a cabo la isomerización en disolución de n-decano ó 1-octanol a temperaturas de 80-120°C (Bernas, A. et. al.; Chem. Común, 2002, 1142-3).

Sin embargo, se ha comprobado que el componente responsable de los efectos anticarcinogénicos del CLA es el isómero cis-9, trans-11, por lo que sería preciso desarrollar métodos de isomerización específicos para la obtención de dicho isómero. Esto se ha intentado por reacción del ácido linoleico con una linoleato isomerasa de la bacteria del rumen *Butyrivibrio fibrisolvens* (Panza, M.W. and Ha Y.L. 1993. U.S. Patent 5,208,356) y por combinación de una preparación sustancialmente pura de una cepa de *Lactobacillus* que es capaz de convertir ácidos grasos con dobles enlaces no conjugados en la configuración cis-9,cis-12 en ácidos grasos con dobles enlaces conjugados entre los que por lo menos un 50% contienen dobles enlaces con la configuración cis-9,trans 11 (Pariza, MW and Yang X-Y, 2000 US Patent 6,060,304). Además, se ha realizado un estudio sobre la selectividad de lipasas en la esterificación de la mezcla de CLA con n-butanol en n-hexano en el que se observó una preferencia de las lipasas de *Candida cylindracea* y *Mucor miehei* en la esterificación del isómero cis-9, trans-11 deseado (Warwel, S.; Borgdorf, R.; Biotechnology Letters, 2000, 22(14), 1151-55).

Como se describe más adelante en el procedimiento de la presente invención puede obtenerse de manera unívoca este isómero activo por desaturación específica del ácido trans 11-octadecenoico.

Para la producción de ácidos grasos poliinsaturados se ha empleado levadura *Saccharomyces cerevisiae* transformada genéticamente con incorporación de genes de diversas desaturasas de ácidos grasos de distinta procedencia (Suzuki, O. et al. W.O. 2001075069 A1, Michinaka, Y. et al.; J. of Oleo Science 2001, 50(5): 359-365.)

En la presente invención se utiliza una Δ -9 desaturasa de *Saccharomyces cerevisiae*, para la producción selectiva de ácidos grasos poliinsaturados.

Descripción de la invención

Descripción breve

La presente invención describe un procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados mediante la incorporación de ácidos grasos olefínicos o acetilénicos de 13-18 átomos de carbono de longitud de cadena como sustratos a una cepa silvestre haploide o diploide de levadura *Saccharomyces cerevisiae* W 303a ó ΔElo1 que permite la generación de un nuevo enlace de configuración Z en la posición 9 de dichos sustratos. La nueva desaturación sólo se produce si la instauración original en los productos suministrados tiene la configuración E o es un acetileno mientras que si el enlace original tiene la configuración Z el sustrato se recupera inalterado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en que los inventores han observado que la adición como sustrato de ácidos grasos monoinsaturados conteniendo una o varias instauraciones a partir de la posición C-11 de la cadena a cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* permite la producción de ácidos grasos poliinsaturados de longitud de cadena C13-C18 con una instauración adicional de configuración Z en la posición 9 de la cadena originada por la Δ-9 desaturasa de la levadura.

Más específicamente, la presente invención se refiere a la producción de ácidos grasos poliinsaturados de longitud de cadena C13-C18 empleando un procedimiento que consiste en cultivos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* W303a haploides o diploides (American Type Culture Collection) y ΔElo1 (deficiente en elongasa) modificada genéticamente (EUROSCARF) a los que se han incorporado como sustratos ácidos grasos conteniendo una o varias instauraciones a partir de la posición C-11 de la cadena para producir compuestos con una instauración adicional de configuración Z en la posición 9 de la cadena, entre otros, pertenecientes al siguiente grupo: Z9,E 11:13; Z9,E11:14; Z9,E11:15; Z9,E11:16; Z9,E11:18; Z11:13; Z11:14; Z11:15; Z11:16 y Z9,11,11:13 mediante la incubación con las cepas W303a haploides o diploides, y Z9,E11:13; Z9,E11:14; Z9,E11:15; Z9,E11:16; Z9,E11:18; Z11 :13; Z11 :14; Z11 :15; Z11 :16 y Z9,11,11:13 mediante la incubación con la cepa ΔElo1, resoectivamente.

Se ha observado que los sustratos suministrados a la levadura con dobles enlaces con configuración E o trans son desaturados por la Δ-9 desaturasa de la levadura mucho más rápidamente que los correspondientes isómeros Z o cis con la formación de un nuevo doble enlace de configuración Z o cis en posición 9 de la cadena alifática produciéndose los correspondientes derivados Z9E11 (cis9,trans11). Asimismo, tal como se indica más abajo en la Tabla I, se ha comprobado que en los casos de utilización de las cepas haploides y diploides W303a se produce un alargamiento parcial de dos de la cadena del sustrato original manteniéndose la desaturación en la posición 9 del nuevo sustrato, elongación que no se produce cuando se emplean las cepas ΔElo1.

Los productos obtenidos pueden tener aplicación en la industria farmacéutica como anticancerígenos (por ejemplo el compuesto Z9E11), en las industrias agroalimentarias como nutracéuticos, en cosmética y en la industria de química fina como intermedios para la síntesis de feromonas de insectos para su aplicación dentro del control integrado de plagas de insectos por métodos biorracionales.

Sin que ello presuponga una limitación en la aplicación de la presente invención que se define en las reivindicaciones especificadas más adelante vamos a describir un ejemplo concreto de aplicación.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados con levaduras por incorporación de sustratos olefínicos o acetilénicos

Cultivos de levaduras con sustratos

El crecimiento de colonias de levadura W303a haploide y diploide y ΔElo1 (deficiente en elongasa) se realizó en medio sólido con placas de YPD-agar a 37°C durante 24 h. A partir de una solución etanólica 1M de ácido graso sustrato se añade a una única colonia de levadura en 2 mL de medio líquido YPD-tergitol (1%) de manera que los ácidos grasos estén en una concentración final de 0,25-1 mM de sustrato, preferentemente 0,5 mM. La mezcla se deja crecer durante 24-48 horas, preferentemente 24 horas a 37°C en agitación a 200-300 rpm, preferentemente 200 rpm.

Procedimiento de extracción de los distintos ácidos

Se trasvasa el medio de cultivo a un vial de tipo eppendorf de 1,5 ml y se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descarta y se acaba de transvasar el medio de cultivo restante y se centrifuga en las mismas condiciones anteriores. Se descarta el sobrenadante y se lava con 1 mL de agua y se repiten las operaciones de lavado, centrifugación y eliminación del sobrenadante dos veces más. Finalmente, se centrifuga a 3000 rpm durante 2 min. para eliminar totalmente el agua. Se añade 1 mL de CHCl₃:MeOH (2:1) y se deja en agitación con un brazo mecánico durante 1 h. Finalmente, se centrifuga a 13200 rpm 15 s. se pasa el extracto orgánico a un vial de 3 mL y se evapora el

disolvente.

El residuo de ácidos grasos fue metanolizado por adición de 0,5 mL de una disolución 0,5N de KOH en MeOH, seguido de neutralización después de 30 min con 0,5 mL de HCl 1N y extracción con 0,5 mL de hexano. La capa orgánica se separa, se concentra hasta un volumen de 20 μ L y se analiza por CG-EM.

Análisis de los ácidos obtenidos

Los ésteres metílicos se analizan por CG-EM en una columna apolar HP-1 con el siguiente programa de temperaturas 80°C (0)/5/200(0)/10/300 (10).

La posición de los dobles enlaces conjugados se analizó por CG-EM por formación de los complejos con MTAD (4-metil-1,2,4-triazolin-3,5-diona). Estos complejos se forman por adición de 2,5 μ L de una disolución de 1,2 mg de MTAD en 1mL de CH₂Cl₂ sobre 10 μ L de extracto hexánico, agitando y evaporando hasta un volumen final de 2 μ L. Se inyecta en CG-EM con el siguiente programa de temperaturas 80°(0)/5/200(0)/10/300 (25).

La posición de dobles enlaces no conjugados se determinó por formación de complejos con DMDS (sulfuro de dimetilo). Estos complejos se forman por adición sobre 20 μ L de extracto hexánico, 50 μ L de disulfuro de dimetilo y una gota de solución de yodo en dietil éter (60 mg/mL). La mezcla se calienta a 45-50° durante 72 h.

Pasado este tiempo se diluye con hexano, se elimina el yodo con una solución saturada de Na₂S₂O₃, se lava con H₂O y se separa la fase orgánica. El volumen de hexano se concentra a 20 μ L y se analiza por CG-EM inyectando 1 μ L bajo las condiciones arriba indicadas.

Resultados

Los sustratos empleados fueron una serie de ácidos grasos monoinsaturados de 13-18 átomos de carbono en la cadena que en la posición 11 poseían un doble enlace de estereoquímica Z o E o un triple enlace.

Estos ácidos eran accesibles comercialmente o fueron sintetizados en nuestro laboratorio por métodos convencionales. Como se indica en la Tabla I los sustratos con estereoquímica E o trans en el doble enlace o un triple enlace son desaturados por la levadura en la posición 9 dando los correspondientes derivados Z9E11, mientras que bajo las condiciones de la incubación, 24 horas a 37° agitando a 200 rpm, los correspondientes sustratos con estereoquímica Z o cis se recuperan inalterados.

Las cepas W303a haploide y diploide que contienen elongasa son capaces de prolongar la cadena en 2, dependiendo del sustrato. En estos casos los nuevos ácidos grasos formados con insaturaciones en posiciones 13 ó 15 pueden desaturarse a los correspondientes Z9E13 y Z9E15. En el caso de sustratos con dobles enlaces de configuración Z11 no se observa una ulterior desaturación a pesar de obtenerse por elongación de la cadena los correspondientes sustratos con dobles enlaces de configuración Z13 y Z15. Además, los dienos Z9E11 formados pueden ser alargados a los correspondientes Z11E13 y Z13E15.

Cuando se utilizan cepas de levadura deficientes en elongasa (Δ Elo1) sólo se obtienen los dienos Z9E11 resultantes de la desaturación.

En todos los casos se observan ácidos endógenos propios de la levadura como son el palmitoleico (Z9:16) y el oleico (Z9:18).

ES 2 204 328 B1

TABLA I

Ácido sustrato* Cepa levadura Productos detectados
 Mayoritario Minoritario

E11:13	W303a haploide o diploide	Z9,E11:13	Z11,E13:15 Z9E13:15 E13:15
E11:13	ΔElo1	Z9,E11:13	-----
E11:14	W303a haploide o diploide	Z9,E11:14	Z11E13:16 E13:16
E11:14	ΔElo1	Z9,E11:14	-----
E11:15	W303a haploide o diploide	Z9,E11:15	Z11E13:17 E13:17 Z9E13:17
E11:15	ΔElo1	Z9,E11:15	-----
E11:16	W303 a haploide o diploide	Z9,E11:16	Z11E13:18 Z9E13:18 E13:18
E11:16	ΔElo1	Z9,E11:16	-----
E11:18	W303a haploide o diploide	Z9,E11:18	-----
E11:18	ΔElo1	Z9,E11:18	-----
Z11:13	W303a haploide o diploide	Z11:13	Z13:15
Z11 :13	ΔElo1	Z11 :13	
Z11:14	W303a haploide o diploide	Z11:14	Z13:16
Z11:14	ΔElo1	Z11:14	
Z11:15	W303a haploide o diploide	Z11:15	Z13:17
Z11 :15	ΔElo1	Z11 :15	-----
Z11:16	W303a haploide o diploide	Z11:16	Z13:18
Z11 :16	ΔElo1	Z11 :16	-----
11,11:13	W303a haploide o diploide	Z9,11,11:13	Z111313:15 13,13:15
11,11:13	ΔElo1	Z9,11,11:13	-----

* Configuración y posición insaturación:longitud cadena.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de ácidos grasos poliinsaturados **caracterizado** porque está constituido por las siguientes etapas:

a) incubación de sustratos monoinsaturados con cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido YPD-tergitol (1%) conteniendo 0,25-1 mM de sustrato, preferentemente 0,5 mM, a una temperatura de 37°C, durante 24-48 horas, preferentemente 24 horas, agitando a 200-300 rpm, preferentemente 200 rpm;

b) extracción y purificación de los ácidos grasos poliinsaturados del medio de cultivo resultado de la incubación de a).

2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* pertenece entre otras al siguiente grupo: cepa haploide W303a conteniendo elongasa, cepa diploide W303a conteniendo elongasa y cepa Δ Elo1 deficiente en elongasa.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 2 **caracterizado** porque el sustrato empleado son ácidos grasos monoinsaturados de 13 a 18 átomos de carbono en la cadena que en la posición 11 poseían un doble enlace de configuración Z o E o un triple enlace.

4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque el producto resultante de la incubación con un doble enlace en la posición 9 puede ser alargado en su cadena por las elongasas de la levadura, W303a haploide o diploide, dando nuevos productos que contienen dobles enlaces en las posiciones 11 y 13.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el producto resultante poliinsaturado mayoritario de dicho procedimiento pertenece, entre otros posibles, al siguiente grupo: Z9,E11:13; Z9,E11:14; Z9,E11:15; Z9,E11:16; Z9,E11:18; Z11:13; Z11:14; Z11:15; Z11:16 y Z9,11,11:13.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 3 **caracterizado** porque el producto resultante de la incubación con un doble enlace en la posición 9 no es alargado en su cadena y porque la cepa utilizada es la cepa Δ Elo1 deficiente en elongasa.

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque el producto resultante poliinsaturado de dicho procedimiento pertenece, entre otros posibles, al siguiente grupo: Z9,E11:13; Z9,E11:14; Z9,E11:15; Z9,E11:16; Z9,E11:18; Z11 :13; Z11 :14; Z11 :15; Z11 :16 y Z9,11,11:13.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 204 328

⑫ Nº de solicitud: 200202282

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.10.2002

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12P 7/64 // (C12P 7/64, C12R 1:865)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHUANG, L.-T. et al.: "Inhibitory Effect of Conjugated Linoleic Acid on Linoleic Acid Elongation in Transformed Yeast with Human Elongase", Lipids, (2001), Vol. 36, nº 10, páginas 1099-1103, todo el documento.	1-7
A	WO 0175069 A1 (IDEMITSU PETROCHEM. CO. LTD.) 11.10.2001 (resumen) WPI [en línea] Londres (Reino Unido): Derwent Publications, Ltd. [recuperado el 28.11.2003]. Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., DW 200174, Nº de acceso: 2001-648552.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.01.2004

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1